

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(54) FLUORESCENT LABELLING DYE, BIOGENIC SUBSTANCE LABELLED

WITH THE SAME, AND REAGENT CONTAINING THEM

(11) 5-287209 (A) (43) 2.11.1993 (19) JP

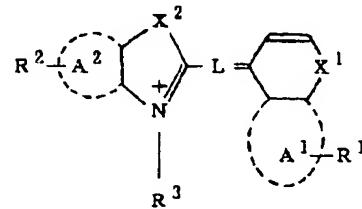
(21) Appl. No. 4-88743 (22) 9.4.1992

(71) HITACHI CHEM CO LTD (72) MITSUO KATA YOSE(2)

(51) Int. Cl^s. C09B23/00, C09K11/06, G01N21/64, G01N21/78, G01N33/533

PURPOSE: To obtain a reagent useful for analyzing various antigens and drugs in blood or for analyzing DNA sequence with a small semiconductor laser (670-780nm) by using a dye for fluorescent labeling comprising a compd. having a specified molecular structure.

CONSTITUTION: This dye is represented by the formula, wherein A¹ and A² are each independently an arom. ring comprising carbon and hydrogen atoms or an arom. ring contg. nitrogen and/or oxygen and/or sulfur atoms in addition to carbon and hydrogen atoms; R¹, R², and R³ are each independently an alkyl, alkoxy, aryloxy, aryl, or aralkyl group, etc.; X¹ is a sulfur, oxygen, or selenium atom, etc.; X² is a sulfur, oxygen, or selenium atom, C=O, CH=CH, etc.; and L is a polymethylene group. A reagent contg. the color or contg. a biogenic substance labeled with the color is applied in various analyses.



(54) PRODUCTION OF AZOMETHINE DYE AND INDOANILINE DYE

(11) 5-287210 (A) (43) 2.11.1993 (19) JP

(21) Appl. No. 4-109130 (22) 3.4.1992

(71) FUJI PHOTO FILM CO LTD (72) TAKAYOSHI KAMIO(1)

(51) Int. Cl^s. C09B55/00, B41M5/30, C09B53/00, G03C1/12

PURPOSE: To produce an azomethine or indoaniline dye readily at a high productivity with a low cost by oxidatively condensing a hydrolyzate of an N-acyl-p-phenylenediamine compd. with an active methylene group or a compd. having an active methylene group without purifying the hydrolyzate.

CONSTITUTION: An N-acyl-p-phenylenediamine compd. is hydrolyzed. The hydrolyzate which contains a p-phenylenediamine compd. formed during the hydrolysis is used as it is without isolating the p-phenylenediamine compd. and is oxidatively condensed with an active methylene group or a compd. having an active methylene group under a basic condition, thus giving an azomethine or indoaniline dye. The hydrolysis is carried out by using an acid, pref. hydrochloric acid, and proceeds without causing any side reaction, forming the p-phenylenediamine compd.

(54) FLAKY PIGMENT COATED WITH ULTRAFINE BARIUM SULFATE PARTICLE AND ITS PRODUCTION

(11) 5-287212 (A) (43) 2.11.1993 (19) JP

(21) Appl. No. 4-134100 (22) 10.4.1992

(71) MERCK JAPAN K.K. (72) TAMIO NOGUCHI(1)

(51) Int. Cl^s. C09C3/06, A61K7/02

PURPOSE: To provide the subject pigment which has not only improved extensibility on and adhesion to the skin but also light-scattering capability.

CONSTITUTION: Ultrafine barium sulfate particles having a mean particle diameter of 0.1μm or lower are deposited on the surfaces of fine flaky particles of a pigment substrate by using an aq. soln. of a complex-forming agent capable of forming a complex compd. with a barium ion, an aq. soln. of a water-sol. barium compd., and an aq. soln. contg. sulfate ions, thus giving the objective pigment. This pigment is used for coloring pigments for cosmetics, automotive topcoating, plastic, printing ink, electrical home appliance, paint, and building paint.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-287209

(43)公開日 平成5年(1993)11月2日

(51)Int.Cl.⁵
C 0 9 B 23/00
C 0 9 K 11/06
G 0 1 N 21/64
21/78

識別記号 庁内整理番号
K 7375-4H
M 7375-4H
Z 6917-4H
Z 9115-2J
C 7906-2J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 6(全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-88743

(22)出願日 平成4年(1992)4月9日

(71)出願人 000004455

日立化成工業株式会社

東京都新宿区西新宿2丁1番1号

(72)発明者 片寄 光雄

茨城県日立市東町4丁目13番1号 日立化成工業株式会社茨城研究所内

(72)発明者 田井 誠司

茨城県日立市東町4丁目13番1号 日立化成工業株式会社茨城研究所内

(72)発明者 渡辺 博夫

茨城県日立市東町4丁目13番1号 日立化成工業株式会社茨城研究所内

(74)代理人 弁理士 若林 邦彦

(54)【発明の名称】 蛍光標識用色素、蛍光標識用色素で標識された生物由来物質、及びそれらを含有する試薬

(57)【要約】

【目的】 670～780nm付近に発振波長をもつ小型半導体レーザを用いて測定するための、種々の抗原・薬物の分析やDNAの塩基配列の分析等に有用な試薬を提供する。

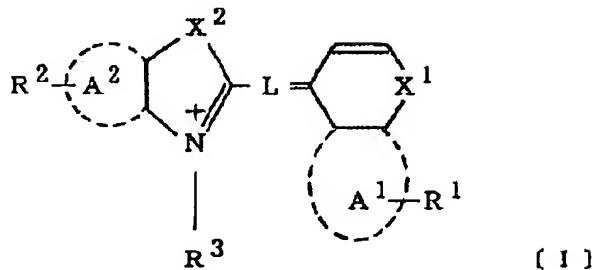
【構成】 一般式(I)で表される蛍光標識用色素、それによって標識されたビタミン、ヌクレオチドもしくはタンパク質等の生物由来物質、又はこれらを含有する試薬。

【化1】 (一般式(I)中、A¹及びA²はそれぞれ独立にベンゼン環、ナフタレン環等であり、R¹～R³はそれぞれ独立に水素原子、アルキル基、アルコキシ基等であり、X¹は硫黄原子、酸素原子等であり、X²は硫黄原子、酸素原子、C=O等であり、Lはポリメチレン基である。)

【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式(I)

【化1】



【一般式(I)中、

A¹及びA²は、それぞれ独立に、炭素原子及び水素原子から成る芳香環、又は炭素原子及び水素原子のほかに窒素原子及び/又は酸素原子及び/又は硫黄原子から成る芳香環を示し、

R¹、R²及びR³は、それぞれ独立に、アルキル基、複素環残基、アルコキシ基、アリーロキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アリール基、アラルキル基、アルキルカルボニルオキシ基、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、アルキルオキシカルボニル基、アルキルアミド基、アルキルスルfonylamido基、アルコキシカルボニル基、アリーロキシカルボニル基、アリールカルボニルオキシ基、アリールアミド基、アルキルアミノ基、アルキルカルバモイル基、アルキルスルファモイル基、アリールカルバモイル基、アリールアミノ基、アリールスルフォニル基、アリールスルfonylamido基、水酸基、カルボキシ基、ハロゲン原子、アリールスルファモイル基、シアノ基、ニトロ基、スルфон酸、スルfonyl酸塩、カルボン酸塩、これらを置換基にもつアルキル基、又は水素原子を示し、

X¹は、硫黄原子、酸素原子、セレン原子、NR⁴（ただし、R⁴はR¹～R³と同じ意味）を示し、

X²は、硫黄原子、酸素原子、セレン原子、C=O、C=H=CH、NR⁵又はCR⁶R⁷（ただし、R⁵、R⁶及びR⁷はR¹～R³と同じ意味）を示し、Lは、ポリメチレン基を示す。】で表される蛍光標識用色素。

【請求項2】請求項1記載の蛍光標識用色素を含有する試薬。

【請求項3】請求項1記載の蛍光標識用色素で標識された生物由来物質。

【請求項4】請求項3の生物由来物質を含有する試薬。

【請求項5】生物由来物質がビタミン、アルカロイド又はヌクレオチドである請求項3記載の生物由来物質。

【請求項6】生物由来物質がビタミン、アルカロイド又はヌクレオチドである請求項4記載の試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、蛍光標識用色素、蛍光

標識用色素で標識された生物由来物質、及びそれらを含有する試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】フタロシアニン類は種々の免疫分析に使用できることが種々報告されている（U.S.特許第4,160,645号公報、U.S.特許第4,193,983号公報、U.S.特許第4,220,450号公報、U.S.特許第4,233,402号公報、U.S.特許第4,235,869号公報、U.S.特許第4,256,834号公報、U.S.特許第4,277,437号公報、U.S.特許第4,318,707号公報、U.S.特許第4,483,929号公報、U.S.特許第4,540,660号公報、U.S.特許第4,540,670号公報、U.S.特許第4,560,534号公報、U.S.特許第4,650,770号公報、U.S.特許第4,656,129号公報、U.S.特許第4,659,676号公報）。

【0003】更に、フタロシアニン類は、化学発光免疫分析系で触媒として使用されている〔Buill. Chem. Soc. Jpn. 第56巻、2965-2968頁（1983）、同第56巻、2267-2271頁（1983）、同第57巻、587-588頁（1984）、同第57巻、3009-3010頁（1984）、同第58巻、1299-1303頁（1985）〕。原らは、ルミノールと過酸化水素とのあいだの化学発光反応の触媒として鉄フタロシアニンを用いて、化学発光のシグナル量から、テストサンプル中の分析対象を定量している。彼らは鉄及びコバルトのフタロシアニン並びに鉄、パラジウム、白金、マンガン及びスズのポルフィリン錯体について検討し、鉄フタロシアニンが最も優れた触媒作用を示し、かつ高感度であることを報告した。

【0004】免疫分析で着色物質のほかに螢光物質が広く利用されているが、さらに、酵素免疫分析においても、螢光物質は感度を上げることができるので着色物質よりも好んで使用されるようになってきている。よく知られた螢光物質-酵素対はアルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase）と4-メチルウムベリフェリルホスフェート（4-methylumbelliferyl phosphate）、β-ガラクトシダーゼ（β-galactosidase）と4-メチルウムベリフェリル-D-ガラクトピラノシド（4-methylumbelliferyl-D-galactopyranoside）、西洋ワサビのペーオキシダーゼ（horse radish peroxidase）とp-ヒドロキシフェニル酢酸（p-hydroxyphenyl acetic acid）等があり、これらの系の検出感度は10⁻¹⁵ Mである。しかし検出感度をさらに上げようとしても生成する螢光体の分析特性には限界がある。

【0005】最近、螢光量子収率が高く、水に対して高い溶解性を示すフタロシアニン類を用いた試薬が提案された（WO特許第88/04777号公報、WO特許第90/02747号公報、特開平1-233222号公報）。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】しかし、フタロシアニン類は、そのQ-バンドの吸収域及び蛍光発光域が655~700nmの領域にあって、生体内物質として存在する血液中のヘム等の吸収域(<700nm)と重なっているため、その妨害を受ける欠陥がある。

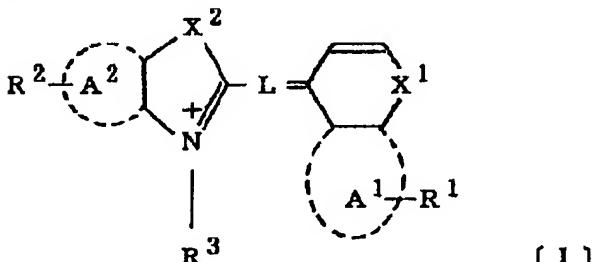
【0007】また、放射線光源は今後安価で小型の半導体レーザ(670~780nm)が主流になると考えられるが、670~690nmの半導体レーザで励起する場合に、フタロシアニン類は蛍光発光領域がこれと同様の波長域にあるため、照射レーザ光からの散乱光と蛍光発光を区別することが困難であるだけでなく、700~780nmの半導体レーザで励起する場合には、フタロシアニン類は光を吸収できないため励起されず、したがって検出薬としての役目を果たさない。更に、フタロシアニン類は大きなπ共役系を有するために会合しやすい性質があり、会合体が生成すると蛍光量子収率が著しく低下する欠点がある。

【0008】本発明は、血液中に存在するヘム等の生体内物質に影響されず、また、将来主流になると予想される安価で小型の半導体レーザ(670~780nm)を用いて測定するための、血液中の種々の抗原、薬物の分析やあるいはDNAの塩基配列の分析等に有用な試薬又は臨床検査試薬を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は下記(1)~(6)に関するものである。すなわち、(1)一般式(I)

【化2】



【一般式(I)中、A¹及びA²は、それぞれ独立に、炭素原子及び水素原子から成る芳香環、又は炭素原子及び水素原子のほかに窒素原子及び/又は酸素原子及び/又は硫黄原子から成る芳香環を示し、R¹、R²及びR³は、それぞれ独立に、アルキル基、複素環残基、アルコキシ基、アリロキシ基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アリール基、アラルキル基、アルキルカルボニルオキシ基、アルキルカルボニル基、アリールカルボニル基、アルキルオキシカルボニル基、アルキルアミド基、アルキルスルfonylアミド基、アルコキシカルボニル基、アリロキシカルボニル基、アリールカルボニルオキシ基、アリールアミド基、アルキルアミノ基、アルキルカルバモイル基、アルキルスルファモイル基、アリールカルバモイル基、アリールアミノ基、アリールスルfonylアミド基、水酸基、カルボキシ基、ハロゲン原子、アリールスルファモイル基、シアノ基、ニトロ基、スルfonyl酸、スルfonyl酸塩、カルボン酸塩、これらを置換基にもつアルキル基、又は水素原子を示し、X¹は、硫黄原子、酸素原子、セレン原子、NR⁴（ただし、R⁴はR¹~R³と同じ意味）を示し、X²は、硫黄原子、酸素原子、セレン原子、C=O、CH=CH、NR⁵又はCR⁶R⁷（R⁶、R⁷及びR⁷はR¹~R³と同じ意味）を示し、しは、ポリメチレン基を示す。】で表される蛍光標識用色素。

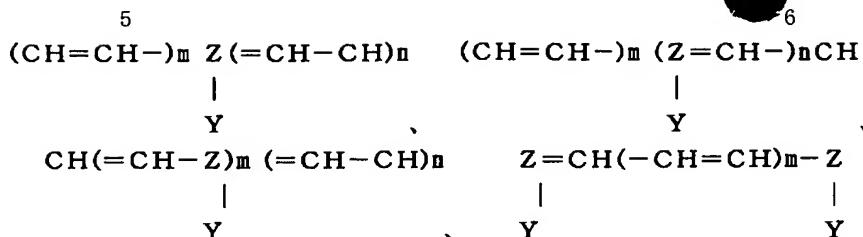
10 (2) 上記(1)の蛍光標識用色素を含有する試薬。
(3) 上記(1)の蛍光標識用色素で標識された生物由来物質。
(4) 上記(3)の生物由来物質を含有する試薬。
(5) 生物由来物質がビタミン、アルカロイド又はヌクレオチドである上記(3)の生物由来物質。
(6) 生物由来物質がビタミン、アルカロイド又はヌクレオチドである上記(4)の試薬。

20 【0010】本発明の一般式(I)で表される化合物において、A¹及びA²の炭素原子及び水素原子から成る芳香環の具体例としては、ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、フェナントレン等があり、炭素原子及び水素原子のほかに窒素原子及び/又は酸素原子及び/又は硫黄原子から成る芳香環の具体例としては、ピリジン、1,2-ジアジン、1,3-ジアジン、1,4-ジアジン、キノリン、イソキノリン、キノキサリン、1,3-ベンゾジアジン、2,3-ベンゾジアジン、1,8-ジアザナフタレン、1,5-ジアザナフタレン、1,7-ジアザナフタレン、1,6-ジアザナフタレン、ピロール、イミダゾール、チオフェン、フラン等がある。これらの芳香環は任意の可能な位置で縮環できる。

30 【0011】本発明の一般式(I)で表される化合物において、R¹~R³、並びにX¹及びX²中のR⁴~R⁷のアルキル基又はアルキル基を含む基のアルキル基の具体例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、sec-プロピル基、n-ブチル基、iso-ブチル基、t-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基等があり、アリール基又はアリール基を含む基のアリール基の具体例としては、フェニル基、ナフチル基、アントラニル基、フェナントレニル基等があり、複素環残基の具体例としてはピリジル基、ピリダジル基、ピリミジル基、ピラジル基、キノリル基、イソキノリル基、キノキサリル基、ベンゾピリミジル基、ベンゾピリダジル基、ジアザナフチル基、ピロリル基、イミダジル基、チエニル基、フリル基等がある。

40 【0012】Lで表されるポリメチレン基としては、次の化3で表される基等がある。

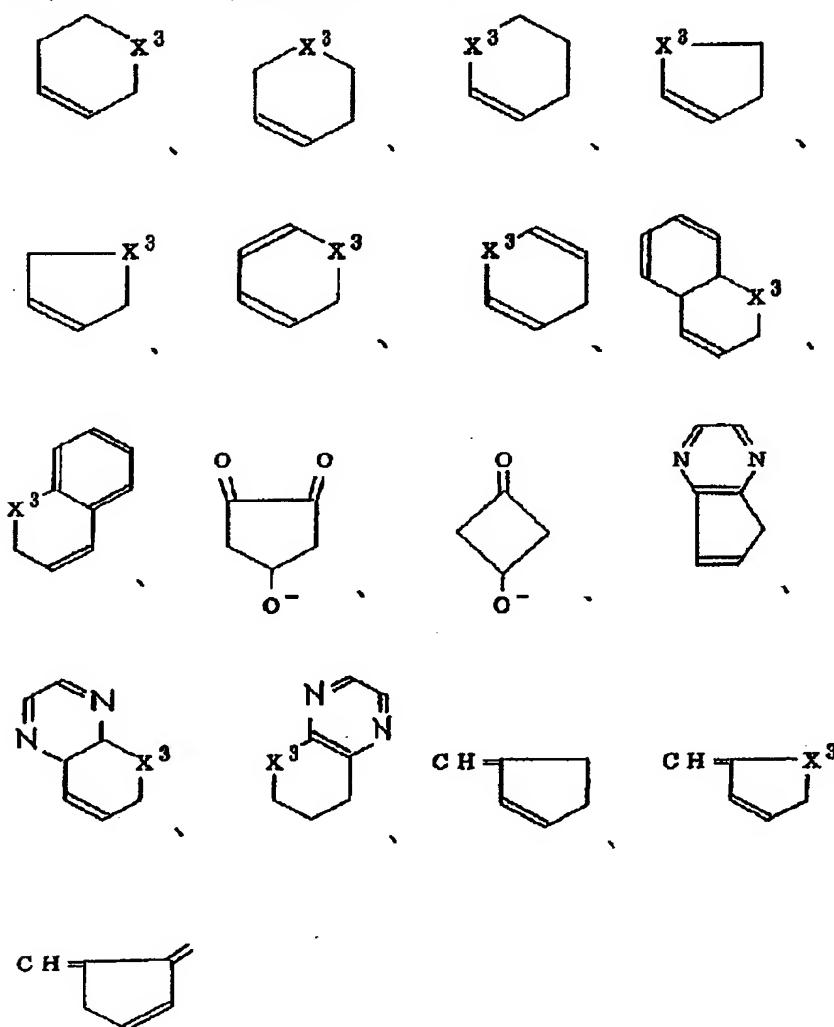
【化3】



【0013】化3中、m及びnは0～5の整数であり、Yは水素原子、メチル基等の低級アルキル基、メトキシ基等の低級アルコキシ基、ジメチルアミノ基、ジフェニルアミノ基、メチルフェニルアミノ基、モルフォリノ基、イミダゾリジン基及びエトキシカルボニルピペラジン基等のジ置換アミノ基、アセトキシ基等のアルキルカルボニルオキシ基、メチルチオ基等のアルキルチオ基、シアノ基、ニトロ基、又はハロゲン原子等であり、ま

*た、Zは二重結合を共役させるための基で、具体的には、-CH-、シクロヘキサジエン、シクロペントジエン、インデン、1, 4-ジヒドロナフタレン、1, 2-10ジヒドロナフタレン、5, 8-ジヒドロキノキサリン、5, 6-ジヒドロキノキサリンのほか、化4に示す基などが挙げられる。

【化4】



ただし、化4中、X³はN-R⁸（ただし、R⁸はアルキル基を示す）、硫黄原子又は酸素原子である。

【0014】本発明において、一般式（I）で表される化合物は、例えば、「大有機化学、含窒素複素環化合物※

※I」432ページ（朝倉書店）等の参考書に記載された方法によって合成できる。一般式（I）で表される化合物の例を表1に示す。

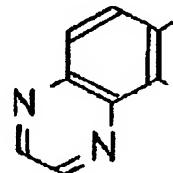
【表1】

表1 一般式（I）で表される化合物の例

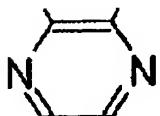
No.	A ¹	X ¹	R ¹	L	A ²	X ²	R ²	R ³
1	化5	N-C ₂ H ₅	-	化9	化5	C(CH ₃) ₂	-	(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻
2	化5	N-C ₂ H ₅	-	化9	化5	N-C ₂ H ₅	-	(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻
3	化5	N-C ₂ H ₅	-	化9	化6	S	-	(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻
4	化5	N-C ₂ H ₅	-	化9	化6	C=O	-	(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻
5	化5	O	CH ₃	化10	化5	C(CH ₃) ₂	-	(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻
6	化5	S	CH ₃	化10	化12	C(CH ₃) ₂	SO ₃ Na	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
7	化5	Se	CH ₃	化10	化12	CH=CH	SO ₃ Na	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
8	化6	N-CN	-	化9	化13	CH=CH	Cl	(CH ₂) ₂ COO ⁻
9	化6	N-CH ₃	-	化9	化5	C=O	-	(CH ₂) ₂ PO ₃ ⁻
10	化7	化8	CH ₃	化9	化7	C(CH ₃) ₂	-	CH ₃ ·I ⁻
11	化7	化8	-	化11	化7	N-CH ₃	-	C ₂ H ₅ ·Cl ⁻

ただし、表1中、化5～化13は下記の基を示す。

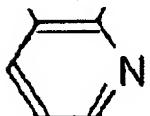
【化5】



【化6】



【化7】



【化8】 N-(CH₂)₃COOH

【化9】 (CH=CH)₂-CH

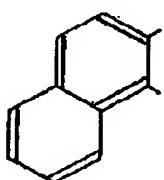
【化10】



【化11】



【化12】



【化13】

【0015】本発明において用いられる生物由来物質としては、動物、植物、微生物（ウイルスを含む）等の生物から得られるタンパク質・ペプチド、ヌクレオチド、糖類、脂質、ホルモン、ビタミン、アルカロイド、抗生素質、それらの複合物等があり、これらは、天然から抽出したもの、人工的に完全合成したもの、あるいは人工的に半合成したものの中のいずれであってもよい。

【0016】タンパク質・ペプチドの具体例としては、30 血清アルブミン、1gG・1gA・1gM・1gD・1gE等の免疫グロブリン、種々のタンパク質や白血球の膜抗原に対するモノクローナル抗体、ペーオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素等が挙げられ、ヌクレオチドの具体例としては

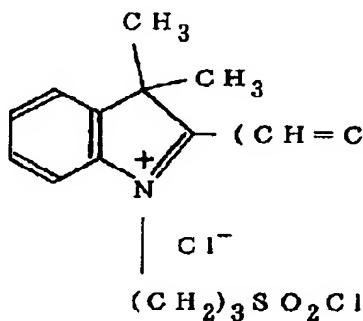
DNA、RNA、合成オリゴヌクレオチド、合成ポリヌクレオチド、ATP、CTP、GTP、UTP、dATP、dCTP、dTTP、dUTP、ddATP、ddCTP、ddGTP、ddTTP、ddUTP、あるいはそれらの誘導体等が挙げられ、糖類の具体例としては、グリコーゲン、デンプン、

マンナン等の多糖類のほかオリゴ糖やグルコース、マンノース等の单糖類が挙げられ、脂質としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノラミン、脂肪、脂肪酸等が挙げられ、ホルモンとしてはインシュリン、成長ホルモン、オキシトシン、バソプレッシン、セクレチン、上皮細胞成長因子、ガストリン、グルカゴン、カルシトニン等のペプチド性ホルモン、アンドロゲン、エストロゲン、ハイドロコorticosteroid等のステロイドホルモン、アドレナリン、ノルアドレナリン等のカテコラミン類等が挙げられ、ビタミンとしてはビタミンA、ビタミ

ンB₁、B₂、B₆、B₁₂、p-アミノ安息香酸（以下、PABAという）、ビオチン、葉酸、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE等の各種ビタミンが挙げられ、アルカロイドとしてはモルフィン等のアヘンアルカロイド、アトロピン、スコポラミン等のトロパンアルカロイド、ビンプラスチン、ビンクリスチン等のインドールアルカロイド、オウレン等のイソキノリンアルカロイド等が挙げられ、抗生物質としては、ペニシリン、セファロスパリン、カナマイシン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール等が挙げられる。

【0017】生物由来物質に蛍光標識用色素を結合させたためには、生物由来物質中のアミノ基、水酸基等の官能基と蛍光標識用色素中のカルボキシル基、スルfonyl基等の官能基を利用して直接、イオン結合的又は共有結合的に直接結合させるか、あるいは蛍光標識用色素が反応できるように、生物由来物質の一部に結合基（リンカー）を付加する等の化学修飾を施したのち、反応させればよい。蛍光標識用色素で標識された生物由来物質はクロマトグラフィー、再結晶等の慣用の分離手段により精製することができる。

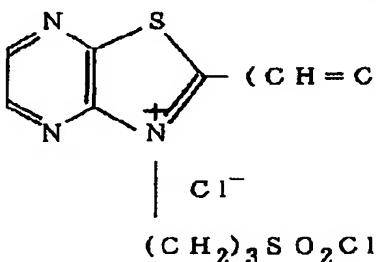
* 20



更に、水1.5mlに炭酸ナトリウム86mg及びp-アミノ安息香酸（PABA）50mgを加え、80℃に加熱して溶かした液に、上記の化14のスルホニルクロライド誘導体51mgを加え、80℃で6時間攪拌後、溶媒を除去し、得られた固体を、10重量%NH₄OHを含むメタノールに溶かし、再度濃縮して、化合物N o. 1のPABA付加体を得た。

【0020】

※



更に、水1.5mlに炭酸ナトリウム78mg及びp-アミノ安息香酸（PABA）50mgを加え、80℃に加熱して溶かした液に、上記の化15のスルホニルクロライド誘導体50mgを加え、80℃で6時間攪拌後、

* 【0018】一般式（I）で表される化合物は、芳香環やポリメチレン基を種々変えることにより、長波長域（700nm以上）の任意の波長域に吸収又は蛍光極大を移動させ、生体中の種々のスペクトル的妨害因子の影響を除くことができるので、血液中の種々の抗原、薬物の分析やあるいはDNAの塩基配列の分析等に有用な試薬又は臨床検査試薬として利用できる。

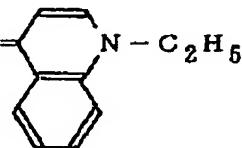
【0019】

【実施例】以下、実施例により更に具体的に本発明を説明する。ただし、化合物N o. 1は表1に示した化合物N o. 1に対応する。

実施例1 化合物N o. 1のPABA付加体の合成

文献（大有機化学、含窒素複素環化合物I、432ページ（朝倉書店））に記載の方法を参考にして、化合物N o. 1を合成した。得られた化合物N o. 1を250mgとり、クロロホルムに溶かし、25℃でオギザリルクロリド2.0mlを滴下し、室温で6時間攪拌したのち、溶媒を除去し、化合物N o. 1の固体状スルホニルクロライド誘導体（化14）を得た。

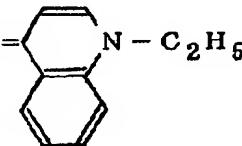
【化14】



※実施例2 化合物N o. 3のPABA付加体の合成

実施例1に記載した文献の方法を参考にして、化合物N o. 3を合成した。得られた化合物N o. 3を601mgとり、クロロホルムに溶かし、25℃でオギザリルクロリド2.3mlを滴下し、室温で6時間攪拌したのち、溶媒を除去し、化合物N o. 3の固体状スルホニルクロライド誘導体（化15）を得た。

【化15】



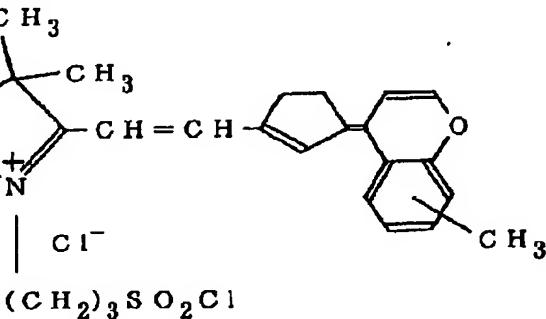
溶媒を除去し、得られた固体を、10重量%NH₄OHを含むメタノールに溶かし、再度濃縮して、化合物N o. 3のPABA付加体を得た。

50 【0021】

11

実施例3 化合物No. 5のPABA付加体の合成

実施例1に記載した文献の方法を参考にして、化合物No. 5を合成した。得られた化合物No. 5を510mgとり、クロロホルムに溶かし、25℃でオギザリルクロリド1.5mlを滴下し、室温で6時間攪拌した。



更に、水1.5mlに炭酸ナトリウム78mg及びp-アミノ安息香酸(PABA)50mgを加え、80℃に加熱して溶かした液に、上記の化16のスルホニルクロライド誘導体49mgを加え、80℃で6時間攪拌後、溶媒を除去し、得られた固体を、10重量%NH4OHを含むメタノールに溶かし、再度濃縮して、化合物No. 5のPABA付加体を得た。

【0022】

* ロリド1.5mlを滴下し、室温で6時間攪拌したのち、溶媒を除去し、化合物No. 5のスルホニルクロライド誘導体(化16)を得た。

【化16】

実施例1に記載した文献の方法を参考にして、化合物No. 6を合成した。得られた化合物No. 6を501mgとり、クロロホルムに溶かし、25℃でオギザリルクロ

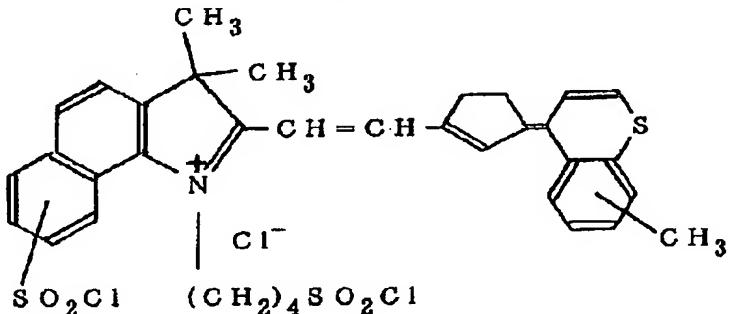
リド1.5mlを滴下し、室温で6時間攪拌したの

ち、溶媒を除去し、化合物No. 6のスルホニルクロ

ライド誘導体(化17)を得た。

20

【化17】



更に、水1.5mlに炭酸ナトリウム78mg及びp-アミノ安息香酸(PABA)50mgを加え、80℃に加熱して溶かした液に、上記の化17のスルホニルクロライド誘導体50mgを加え、80℃で6時間攪拌後、溶媒を除去し、得られた固体を、10重量%NH4OHを含むメタノールに溶かし、再度濃縮して、化合物No. 6のPABA付加体を得た。

【0023】実施例5 化合物No. 1、No. 3、No. 40

又はNo. 6で標識されたモルフィンの合成

実施例1で得た化合物No. 1のPABA付加体(100mg)のトリエチルアミン(1.5ml)溶液に、0℃でクロロギ酸エチル10mlを攪拌しながら加えた。

5分間攪拌後、3-(4-アミノブチル)モルフィン40mgを加え、室温で8時間攪拌して、化合物No. 1★

★で標識されたモルフィンを得た。同様にして、化合物No. 1のPABA付加体の代わりに、化合物No. 3、No. 5及びNo. 6のPABA付加体を用いて反応を行い、それぞれ化合物No. 3、No. 5及びNo. 6で標識されたモルフィンを得た。

【0024】実施例6 抗モルフィンモノクローナル抗体に対する親和性試験

モルフィン、アミノモルフィン及び化合物No. 1、No. 3、No. 5もしくはNo. 6で標識されたモルフィンについて、抗モルフィンモノクローナル抗体に対する親和性(モルフィンに対する親和性を1.0とし、相対値で表す)をトリチウムをラベルしたモルフィンとの競争反応により測定した。測定結果を表2に示す。

【表2】

表2 抗体に対する標識化モルフィンの相対親和性

化合物(抗原)	相対親和性
---------	-------

13	
モルフィン	1. 0
アミノモルフィン	1. 0
化合物No. 1 標識化モルフィン	0. 9
化合物No. 3 標識化モルフィン	1. 0
化合物No. 5 標識化モルフィン	1. 0
化合物No. 6 標識化モルフィン	1. 0

14

【0025】表2の結果から、化合物（抗原）による親和性の違いはほとんどみられず、式（1）で表される化合物でモルフィンを標識しても抗体との親和性はほとんど変わらないことが分かった。

【0026】実施例7 化合物No. 1で標識されたオリゴヌクレオチド・プライマーの合成とDNA塩基配列の分析への応用

（1）リンカーが結合したオリゴヌクレオチド・プライマーの合成

固相CED-フォスフォラミド法を用いた自動DNA合成装置によりプライマー（5' - G T T T C C C A G T C A C G A C - 3'）を合成した。合成したプライマーのリン酸化は、5.0 mMトリス-塩酸（pH 7.6）、1.0 mM塩化マグネシウム、1.0 mMジチオスレイトール、3 mM ATP、T₄-ヌクレオチドカイネースを含む1.00 μlの反応液中で37℃、1時間保温して行った。リン酸化されたプライマーは、ゲル濾過用カラムを使用して高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分離し、リン酸化されたプライマーのピークを集め、凍結乾燥で溶媒を除いた。

【0027】次に、これを2.50 mMの1, 2-ジアミノエタン（pH 6.0）、2.00 mMのエチル-3（3-ジエチルアミノプロピル）カルボジイミド及び1.00 mMのN-メチルイミダゾール（pH 6.0）を含む反応液1.00 μl中、25℃で一晩保温して5'末端のグアノシンのリン酸部にリンカー[NH₂- (CH₂)₂-N- *

* H-]を結合させた。

【0028】（2）化合物No. 1で標識されたオリゴヌクレオチド・プライマーの合成

化合物No. 1で標識されたモルフィンと上記（1）で合成した5'末端グアノシンのリン酸部にリンカーが結合したオリゴヌクレオチド・プライマーを、0.2 M炭酸ナトリウム緩衝液（pH 9.3）中で混合し、25℃で一晩、暗所に保温したのち、HPLCで精製することにより、リンカーを介して化合物No. 1が結合したプライマーを得た。

【0029】（3）DNAの塩基配列の分析

既知の塩基配列のDNAをサンプルとし、リンカーを介して化合物No. 1が結合したプライマーを用いて、それぞれ4種の塩基でサンガーレアクションを行ったのち、それぞれ別々のレーンで電気泳動分離し、780 nmの発振波長の半導体レーザーを搭載したDNAシーケンサーで分析した。その結果、DNAの300塩基までを99%の精度で決定できた。

【0030】

【発明の効果】本発明により、血液中に存在するヘム等の生体内物質に影響されず、また、将来主流になると予想されるに小型の半導体レーザ（670～780 nm）を用いて測定するための、種々の抗原、薬物の分析あるいはDNAの塩基配列の分析等に有用な試薬又は臨床検査試薬を提供できた。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

G 0 1 N 33/533

識別記号 庁内整理番号

8310-2 J

F I

技術表示箇所